

VERGLEICH DER BINDUNG VON PHARMAKA
AN ZWERCHFELLMUSKEL
UND AN ZWERCHFELLMUSKELHOMOGENAT
DER RATTE

Norbert Filous

1977

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Manfred Kiese

VERGLEICH DER BINDUNG VON PHARMAKA AN
ZWERCHFELLMUSKEL UND AN ZWERCHFELLMUSKELHOMOGENAT
DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Norbert Filous

aus

München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 11. 1977



Herrn Prof. Dr. H. Kurz danke ich für die
Überlassung des Themas und für die wertvollen
Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	S. 1
II. Methode.....	S. 4
1. Präparation der Rattenzwerchfelle.....	S. 4
2. Incubation der Zwerchfelle.....	S. 5
3. Homogenisierung und Ultrafiltration.....	S. 6
4. Substanzen.....	S. 8
5. Berechnung des gebundenen Anteils.....	S. 10
III. Ergebnisse.....	S. 12
IV. Diskussion.....	S. 15
1. Wahl des Materials.....	S. 15
a) Wahl des Muskels.....	S. 15
b) Wahl des Puffers.....	S. 15
c) Wahl des Incubationsgefäßes.....	S. 16
d) Wahl der Substanzen.....	S. 17
2. Kritik der Methode.....	S. 18
a) Herstellung des Muskelhomogenates.....	S. 18
b) Incubationszeit.....	S. 19
c) Ultrafiltration.....	S. 19
d) Berechnung des gebundenen Anteils.....	S. 20
3. Diskussion der Ergebnisse.....	S. 22
a) Vergleich zwischen intaktem Muskel und Muskelhomogenat....	S. 22
b) Vergleich der Bindung an mensch- lichen Muskel und Rattenmuskel...	S. 25
c) Zusammenhang zwischen Verteilungs- koeffizient und Bindung an Muskelprotein..	S. 29

V. Zusammenfassung.....	S. 32
VI. Literaturverzeichnis.....	S. 33



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0085

I. EINLEITUNG

Die meist reversible Bindung niedermolekularer, körperfremder Substanzen an Makromoleküle des Körpers spielt eine wichtige Rolle für die Verteilung, Wirkung und Elimination von Pharmaka (Witzgall und Boyens 1964, Keen 1971). Während die Bindung von Hormonen und Metallionen (Fe, Cu, Zn) an Proteine, sowie Substrat-Enzym und Antigen-Antikörper Komplexe eine spezifische Bindungsart darstellen (sog. Schlüssel-Schloß-mechanismus), werden die meisten Pharmaka unspezifisch gebunden. Als Bindungsmechanismen werden elektrostatische Bindung, Wasserstoffbindung und hydrophobe Wechselbeziehungen diskutiert (Scholtan 1964, Nemethy 1967, Aly 1968).

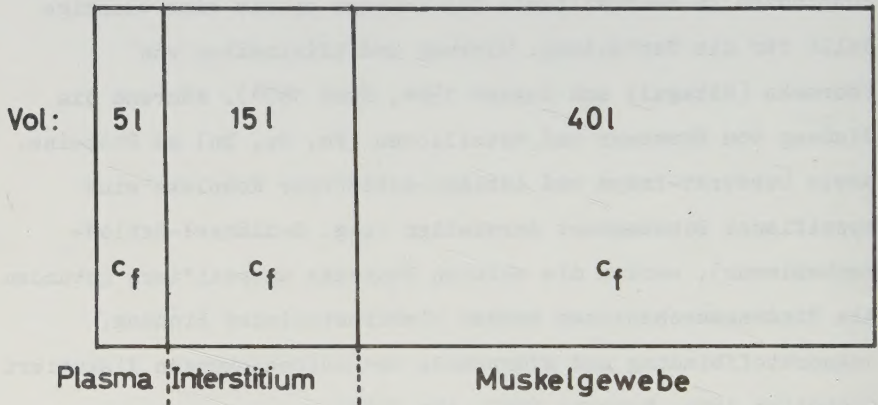
Untersuchungen über diese unspezifische Bindung von Pharmaka an Körperproteine liegen vor allem für Plasmaproteine vor (Übersichten bei Goldstein 1949, Meyer und Gutman 1970).

Plasmaproteine sind im Gegensatz zu Zellproteinen ohne behindernde Membranen für alle Substanzen frei zugänglich.

Da jedoch das Plasma nur etwa 5%, die Skelettmuskulatur aber ca. 40% der Körpermasse beträgt, ist verständlich, daß die Bedeutung einer eventuellen Bindung an Muskelprotein die der Bindung an Plasmaproteine übersteigen muss.

Abbildung 1 erläutert dies an einem vereinfachten Körpermodell (Gesamtkörpervolumen = 100l), wobei eine gleichmäßige Verteilung der Substanz in alle Kompartimente vorausgesetzt wird.

Abbildung 1: Vereinfachtes Körpermodell. c_f ist die freie Konzentration der Substanz bei Konzentrationsgleichgewicht.



Nach diesem Modell kann die Menge der Substanz in den einzelnen Kompartimenten berechnet werden, wobei Q das Verhältnis von gebundenem Anteil zu freiem Anteil ist:

Menge der Substanz im Plasmaraum: $M_{Pl} = c_f \times 5 \times (Q_{Pl} + 1)$

Menge im Interstitium: $M_{Ist} = c_f \times 15$ (keine Bindung)

Menge im Muskelgewebe: $M_{Mu} = c_f \times 40 \times (Q_{Mu} + 1)$

Gesamtmenge: $M_{tot} = c_f \times (60 + 5xQ_{Pl} + 40xQ_{Mu})$

Durch Umformen ergibt sich Gleichung (I):

$$c_f = \frac{M_{tot}}{60 + 5xQ_{Pl} + 40xQ_{Mu}} \quad \text{Gl. (I)}$$

Aus Gleichung (I) ergibt sich, daß c_f stärker von einer eventuellen Bindung an Muskelprotein als an Plasmaprotein abhängt:

Steigt z.B. der an Plasma gebundene Anteil von 50% auf 90% und bleibt dabei der an Muskelprotein gebundene Anteil konstant 50%, so sinkt die freie Konzentration c_f nur um 28%, während im umgekehrten Fall (an Muskelprotein gebundener Anteil steigt von 50% auf 90%, und der an Plasmaprotein gebundene Anteil bleibt konstant 50%) c_f um 75% absinkt.

Um z.B. an die kontraktilen Proteine der Muskelzelle zu gelangen, die nach Filatova und Shtrankfeld (1969) sowie Genazzani und Santamaria (1969) zur Bindung von Fremdstoffen befähigt sind, müssen die Substanzen aber erst eine Membran passieren. Diese stellt besonders für die Diffusion schwach lipidlöslicher Substanzen ein Hindernis dar, so daß es eventuell sehr lange dauert, bis sich das Diffusionsgleichgewicht zwischen Zellinnerem und Zelläußerem einstellt. Um dies zu vermeiden, wurde bisher die Bindung von Pharmaka an Muskelprotein meistens am homogenisierten Muskelgewebe bestimmt (Goldbaum 1954, Kurz 1966, Fichtl 1974). Dies stellt jedoch eine große Änderung gegenüber dem Zustand in vivo dar, denn durch die Zerstörung der Zellmembran wird eventuell in kürzerer Zeit eine sehr viel höhere Konzentration des Pharmakons am Protein erreicht als bei intakten Zellen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Frage zu klären, in wie weit am Homogenat gewonnene Bindungswerte auf den intakten Muskel übertragbar sind.

II. M E T H O D E

1. Präparation der Rattenzwerchfelle

Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Abdomen und Thorax wurden eröffnet und das Zwerchfell mit den unteren drei Rippen herauspräpariert. Da für einen Versuch mehrere Zwerchfelle notwendig waren, wurden sie bis zum Ende der Präparationsarbeiten in 1/8 molarem Phosphatpuffer von pH 7,4 und bei ca. +2 Grad C. aufbewahrt. Dadurch sollte ein Absinken des intrazellulären pH durch postmortal ablaufende, anaerobe Glykolyse verhindert werden. Eine Änderung des pH könnte unter Umständen zu einer Änderung der Proteinbindung führen, wie sie für Plasmaproteine mehrfach beschrieben wurde (Goldbaum und Smith 1954, Klimek und Kurz 1969, Mohr 1970, Curry 1970). Für die fertigen Präparate wurde noch das Zwerchfell von den Rippen gelöst und soweit wie möglich von Fettgewebe befreit. Nach säuberlicher Entfernung von überschüssigem Puffer mittels Filterpapier wurde es gewogen. Die Gewichte der einzelnen Zwerchfelle schwankten zwischen 0,7 und 1,1 g.

Zur Bestimmung des Wassergehalts der Zwerchfelle wurden in einem Vorversuch verschiedene Zwerchfelle im Trockenschrank bei 110 Grad C. bis zur Gewichtskonstanz eingetrocknet. Es ergab sich ein Wassergehalt von $76,0 \pm 0,5\%$. Dieser Wert stimmt mit Literaturwerten für den Wassergehalt von Muskelgewebe gut überein (Smith 1946: 77,0%, Fichtl 1974: 75,5%). Um den Gewichtsanteil des Centrum tendineum zu ermitteln, wurde es vom Zwerchfell abpräpariert und gewogen. Mit ca. 2%

vom Gesamtzwerchfellgewicht ergab sich der Anteil als so gering, daß in den Versuchen das Centrum tendineum belassen wurde.

2. Incubation der Zwerchfelle

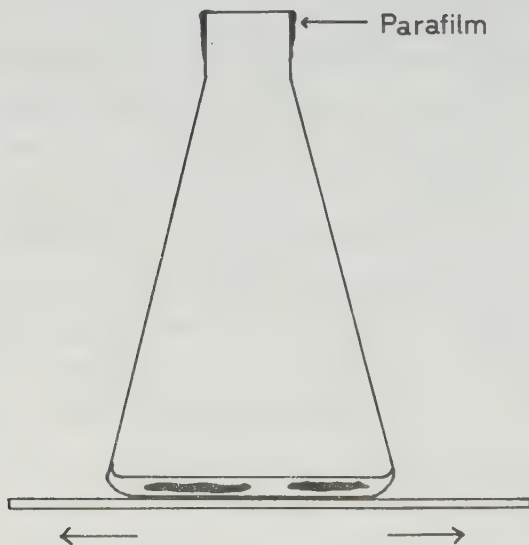
Die Incubationslösung bestand aus einem $1/8$ m Phosphatpuffer von pH 7,4, in den die jeweilige Untersuchungssubstanz bis zu einer Endkonzentration von 2×10^{-4} m gelöst wurde. Anfänglich wurden die Zwerchfelle an einem rostfreien Draht aufgehängt und in ein Reagenzglas von 40,0 cm Länge und 1,0 cm Durchmesser gehängt, in dem 20 ml Incubationslösung eingebracht war. Um eine bessere Konvektion zu erzielen, wurden die Zwerchfelle in der Lösung auf- und abbewegt. Dabei zeigte sich, daß bei den für manche Substanzen sehr langen Incubationszeiten bis zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichts vom Muskel beträchtliches Zellmaterial durch Reiben an der Glaswand abgeschilfert und in der Incubationslösung suspendiert wird.

In einer verbesserten Versuchsanordnung (s. Abb. 2) incubierten wir zwei Zwerchfelle in einem 500ml Erlenmeyer-Kolben in 10 ml Lösung. Um ein Verdunsten der Lösung zu vermeiden, verschlossen wir den Kolben mit Parafilm und bewegten ihn mit einer Frequenz von ca. 60/min hin und her, damit in der Incubationslösung keine Konzentrationsunterschiede auftreten konnten. Diese Arbeiten wurden im Kühlraum bei +2 Grad C. ausgeführt. Bei diesem Vorgehen blieb der Zellabrieb minimal.

Die Incubationszeiten, die nötig waren, um Diffusionsgleichgewicht zu erreichen wurden bestimmt. Sie variierten von 4 h bei Thiopental bis zu 60 h bei Methanthelin. Bei den anderen

Substanzen war nach längstens 12 h das Diffusionsgleichgewicht eingetreten.

Abbildung 2: Vorrichtung zur Incubation der Zwerchfelle.



3. Homogenisieren und Ultrafiltration

Um zu vermeiden, daß abgeschilferte Zellen beziehungsweise gelöste Proteine die Messung des freien Anteils des Pharmakons in der Incubationsflüssigkeit stören, wurden diese von der Incubationsflüssigkeit abgetrennt. Dazu wurden nach der Incubation dem Kolben 3 ml Incubationsflüssigkeit entnommen und in Visking Dialysierschläuche (Durchmesser 7 mm, Porenweite ca. 2,4 nm) abgefüllt. Diese waren vorher 3 x 30 min in Aqua demineralisata gewässert worden, um das Imprägniermittel herauszulösen. Um nicht durch Austrocknen ihre Porenweite zu verändern, wurden die feuch-

ten Schläuche in einer feuchten Kammer bis zu ihrer Benützung aufbewahrt.

In den verbliebenen 7 ml Lösung wurden die incubierten Zwerchfelle homogeniert^{x)} und der dadurch entstandene Muskelbrei ebenfalls in Visking-Schläuche abgefüllt. Aus den Schläuchen waren bereits durch doppeltes Verknöten des einen Endes Säckchen gebildet worden, welche nun durch Verknöten des anderen Endes verschlossen wurden.

Die Ultrafiltration wurde durch Zentrifugieren ausgeführt: Dazu wurden die verknöteten Säckchen in Siebeinsätze mit Edelstahlgitter gelegt, welche in Zentrifugengläser gesteckt wurden. Diese wurden durch einen Deckel und Parafilm verschlossen. Im Kühlraum (+2 Grad C.) zentrifugierten wir mit 1100 x g. Dabei passieren die gelösten Pharmakonmoleküle die Schlauchmembran und sammeln sich im Zentrifugenglas, während Proteine und die Protein-Pharmakon-Komplexe wegen ihrer Größe im Schlauch zurückgehalten werden. Auf diese Weise wurden ca. 1,5 ml abfiltriert (s. Abb. 3).

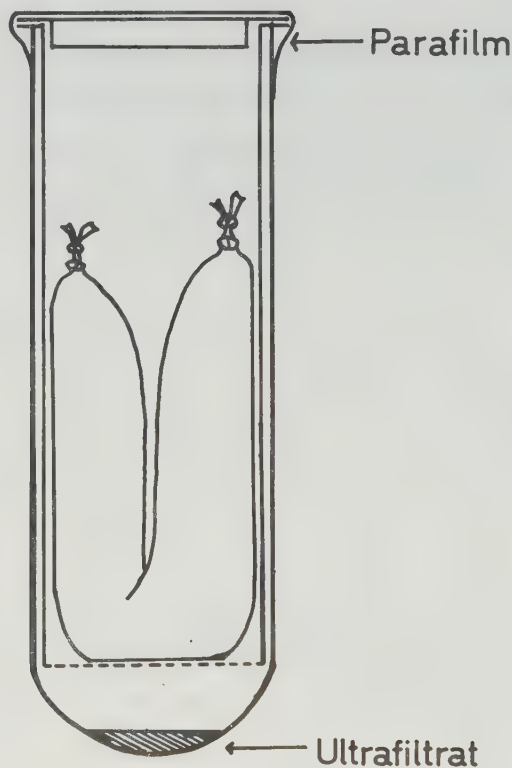
Durch das Arbeiten bei Kühlraumtemperatur sollten

- a) Stoffwechselvorgänge, welche zu pH-Verschiebungen führen, vermindert,
- b) chemische Veränderungen der Substanz (z.B. Hydrolyse) verhindert und
- c) mikrobielles Wachstum in den Schläuchen vermieden werden.

Im Ultrafiltrat wurden die Substanzkonzentrationen gemessen und daraus der an Zwerchfellmuskel bzw. an Zwerchfellmuskelhomogenat gebundene Anteil berechnet.

^{x)} Ultra-Turrax der Fa. Janke und Kunkel

Abbildung 3: Vorrichtung zur Ultrafiltration.



4. Substanzen

Die untersuchten Substanzen sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Konzentrationen in der Incubationsflüssigkeit waren bei allen Substanzen jeweils 2×10^{-4} m.

Die Konzentrationen der Substanzen im Ultrafiltrat wurden durch folgende Nachweismethoden bestimmt:

Salicylsäure · Brodie et al. (1960)

Mecamylamin Schanker et al. (1957)

Phenobarbital	Goldbaum (1948)
Sulfaguanidin und Sulfamethoxydiazin	Bratton und Marshall (1939)
Thiopental	Brodie et al. (1950)
Chlordiazepoxid	Beyer und Sadée (1969)
Methanthelin	Durch Zugabe von 0,5 ml 3n HCl zu 1 ml der ultrafiltrierten Incubationslösung wurde die Esterbindung von Methanthelin gespalten. Die dadurch entstehende Säure wurde in 15 ml Chloroform extrahiert. Davon wurden 10 ml Chloroformphase entnommen. Diese schüttelten wir mit 0,6 ml Methylorange-Reagenz (aa 0,5%ige, wässrige Methylorangelösung und gesättigte Borsäure-Lösung). Nach dem Schütteln wurden 5 ml Chloroformphase entnommen und nach Zugabe von 1 ml einer 2%igen Lösung von konz. H_2SO_4 in absoluten Äthanol die Extinktion bei 540 nm gemessen.

Tabelle 1

Zusammenstellung der untersuchten Substanzen mit Molekulargewicht, pK_a -Wert, Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser bei pH 7,4 und dem Ionisationsgrad bei pH 7,4.

S U B S T A N Z	MOL-GEW	pK_a	VK_{Oct/H_2O}	% ionisiert (pH 7,4)
Salicylsäure	138	3,0	0,0287	> 99,99
Mecamylamin	204	11,2	5,6245	> 99,99
Phenobarbital	232	7,2	16,3	61,3
Sulfaguanidin	232	0,5 2,75 10,5	0,077	< 1,0
Thiopental	242	7,45	606,13	47,1
Sulfamethoxydiazin	280	7,02	0,31	71,2
Chlordiazepoxid	300	4,3	315,0	0,079
Methanthelin	420	--	sehr klein	> 99,99

5. Berechnung des gebundenen Anteils

Die Tabelle 2 gibt an, welche Ansätze zur Bestimmung der Proteinbindung benötigt wurden.

Als Puffer wurde 1/8 m Phosphatpuffer nach Sörensen von pH 7,4 verwendet.

Tabelle 2

Benötigte Ansätze zur Bestimmung der Bindung von Pharmaka an Muskel und an Muskelhomogenat. Angegeben sind die Extinktionen (E) und die Konzentrationen (c) im Ultrafiltrat.

1) 10 ml Puffer ohne Substanz (Blindwert)	E_p^0	
2) 10 ml Puffer mit Substanz	E_p	c_p
3) 10 ml Puffer mit Muskel ohne Substanz	E_M^0	
bzw. mit Muskelhomogenat ohne Substanz	E_H^0	
(s. Methode)		
4) 10 ml Puffer mit Muskel und mit Substanz	E_M	c_M
bzw. mit Muskelhomogenat und mit Substanz	E_H	c_H

Der Wassergehalt des Muskels bzw. des Homogenates sei W (ml/g).

Die Masse der Zwerchfelle sei m (g).

a) Berechnung des an Muskel gebundenen Anteils: A_M (%)

Menge der Substanz vor Incubation: $c_p \times 10$

Menge der Substanz nach Incubation: $c_M \times 10$

Vom Muskel aufgenommene Menge: $(c_p - c_M) \times 10$

Davon sind im Muskelwasser gelöst: $c_M \times W \times m$

Der an Muskel gebundene Anteil an der insgesamt aufgenommenen Menge beträgt also

$$\frac{10 (c_p - c_M) - c_M \times W \times m}{10 (c_p - c_M)}$$

Durch Umformen erhält man Gleichung (II):

$$A_M = \left[1 - \frac{c_M \times W \times m}{10 (c_p - c_M)} \right] \times 100 \quad (\%) \quad \underline{\text{Gl. (II)}}$$

b) Berechnung des an Homogenat gebundenen Anteils: A_H (%)

Vom intakten Muskel bereits aufgenommen: $10 (c_p - c_M)$

3 ml Flüssigkeit wurden entnommen und die zwei Zwerchfelle in den verbliebenen 7 ml homogenisiert.

Nach Homogenisieren noch zusätzlich aufgen. Menge: $7 (c_M - c_H)$

Die insgesamt aufgen. Menge: $10 (c_p - c_M) + 7 (c_M - c_H)$

Nach Homogenisieren im Muskelwasser gelöste Menge: $c_H \times W \times m$

Analog zu Gleichung (II) erhält man Gleichung (III) und

damit den an das Homogenat gebundenen Anteil an der insgesamt aufgenommenen Menge:

$$A_H = \left[1 - \frac{c_H \times W \times m}{10 (c_p - c_M) + 7 (c_M - c_H)} \right] \times 100 \quad (\%) \quad \underline{\text{Gl. (III)}}$$

Angefertigte Eichkurven zeigten, daß das Lambert - Beer'sche Gesetz für die optische Messung der untersuchten Substanzen gültig ist. Deshalb kann statt der absoluten Konzentration der Substanz auch die gemessene Extinktion in die Gleichung eingesetzt werden.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem t-Test für gepaarte Werte.

III. E R G E B N I S S E

In Tabelle 3 sind die Werte für die Bindung von 8 Substanzen an Zwerchfell und an Zwerchfell-Homogenat der Ratte aufgeführt. Angegeben ist der gebundene Anteil in (%) von der insgesamt vom Zwerchfell aufgenommenen Substanzmenge.

Für $B + G = M$ errechnet sich also die an das Zwerchfell bzw. Zwerchfelldomogenat gebundene Substanzmenge zu

$$\frac{B}{B + G} \times 100 \quad (\%), \text{ wobei}$$

M = aufgenommene Gesamtmenge

B = gebundener Anteil

G = nicht gebundener Anteil

Zum Vergleich sind in Tabelle 3 außerdem der Literatur entnommene Werte der Bindung an Muskelhomogenat des Menschen angegeben.

Bei keiner der untersuchten Substanzen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Bindung an Zwerchfell und an Zwerchfelldomogenat der Ratte.

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen Verteilungskoeffizienten und Zellpermeation zu prüfen, wurde die Länge der Incubationszeit zweier Substanzen mit extrem verschiedenen Verteilungskoeffizienten in Abbildung 4 aufgetragen ($VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ für Thiopental: 606,13; für Methanthelin als quartäre Ammoniumverbindung ist der VK nicht meßbar klein).

Dabei ergab sich eine Incubationszeit von ca. 4 h (Thiopental)

bzw. ca. 60 h (Methanthelin) bis zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichts. Diese Zeit liegt bei den anderen Substanzen dazwischen. So war z.B. bei Salicylsäure, die von unseren untersuchten Substanzen nach Methanthelin den kleinsten Verteilungskoeffizienten (0,0287) hat, nach 12 h das Diffusionsgleichgewicht eingetreten.

Tabelle 3

Zusammenstellung der ermittelten Bindungswerte an Zwerchfellmuskel und an Zwerchfellmuskelhomogenat der Ratte.

Angegeben ist der gebundene Anteil mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes, die Anzahl der Messungen (n) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (p).

Daneben sind die Werte für die Bindung an Muskelhomogenat (M. psoas) des Menschen (Fichtl 1974) aufgeführt.

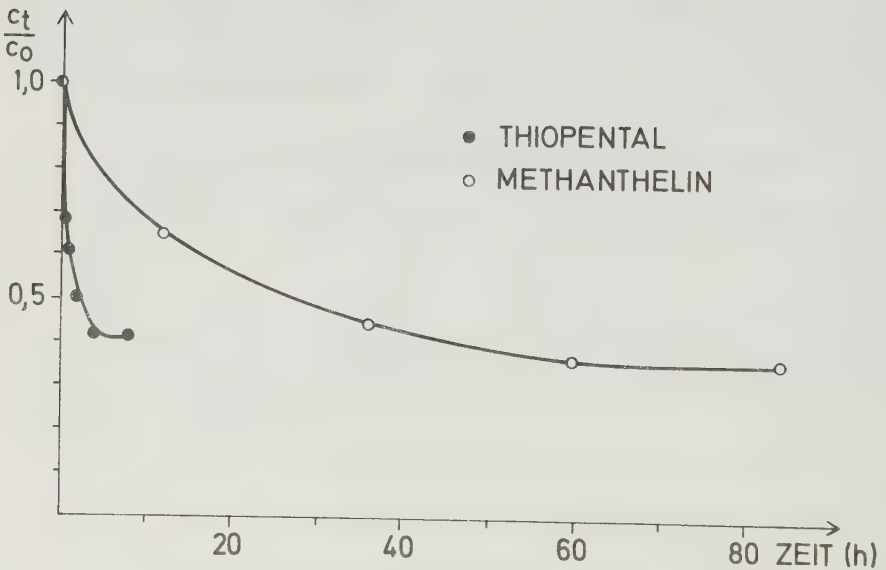
S U B S T A N Z	Gebundener Anteil (in %)				
	Muskel	Homogenat	n	p	Mensch
Thiopental	92, 0 $\pm$ 0, 3	91, 8 $\pm$ 0, 2	8	0, 4	90, 0
Sulfamethoxydiazin	70, 4 $\pm$ 1, 2	69, 9 $\pm$ 1, 2	6	0, 7	64, 3
Chlordiazepoxid	94, 5 $\pm$ 0, 6	94, 2 $\pm$ 0, 6	9	0, 5	88, 8
Phenobarbital	81, 8 $\pm$ 0, 4	81, 6 $\pm$ 0, 7	8	0, 7	66, 9
Sulfaguanidin	73, 1 $\pm$ 0, 5	73, 2 $\pm$ 0, 6	10	0, 7	55, 4
Salicylsäure	68, 7 $\pm$ 0, 8	68, 6 $\pm$ 0, 7	8	0, 8	43, 3
Mecamylamin	60, 4 $\pm$ 0, 5	60, 2 $\pm$ 0, 6	8	0, 7	--
Methanthelin	90, 7 $\pm$ 0, 2	91, 2 $\pm$ 0, 5	4	0, 5	--

Abbildung 3:

Abhängigkeit der Konzentration in der Incubationsflüssigkeit (c_t/c_o) von der Incubationsdauer. Ändert sich die Konzentration in der Incubationsflüssigkeit nicht mehr, so ist Diffusionsgleichgewicht eingetreten.

c_t = Konzentration zum Zeitpunkt t

c_o = Ausgangskonzentration



IV. DISKUSSION

1. Wahl des Materials

a) Wahl des Muskels:

Um die Bindung von Pharmaka an den intakten Muskel bestimmen zu können, war es nötig, einen durch die Präparation möglichst unveränderten Muskel bis zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichts zwischen Incubationslösung und Sarkoplasma in der Substanzlösung zu incubieren. Wegen ihrer Dicke sind bei Skelettmuskeln relativ lange Incubationszeiten bis zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichts nötig. Dies kann durch dünne Schnitte von Skelettmuskulatur vermieden werden (Schanker und Morrison 1966), jedoch werden dabei Zellmembranen zerstört, so daß, ähnlich wie beim Homogenat, Substanzen leichter oder überhaupt erst in die Muskelzelle gelangen könnten. Deshalb suchten wir einen dünnen Muskel mit kurzen Diffusionswegen. Einen geeigneten Muskel glaubten wir im Zwerchfell der Ratte gefunden zu haben. Die Dicke der Zwerchfelle betrug an der dicksten Stelle zwischen 1,0 und 1,5 mm. Um vermeidbare Variable soweit wie möglich auszuschließen, verwendeten wir nur männliche Ratten mit ca. 350 g Gewicht.

b) Wahl des Puffers:

Die Zwerchfelle incubierten wir in 1/8-molarem Phosphatpuffer. Durch die Untersuchungen von Klotz und Urquart (1949) ist bekannt, daß Phosphat-Ionen im Gegensatz zu anderen Ionen überhaupt nicht, oder nur sehr schwach an Albumin gebunden werden. Außerdem werden durch Phosphat-

Ionen keine anderen Ionen aus ihrer Bindung an Albumin verdrängt, jedoch wird z.B. mit steigender Molarität des Phosphatpuffers die Bindung von Sulfonamiden an Albumin geringer (Scholtan 1964). Diese Abnahme der Affinität wird durch die Theorie von Debye und Hückel erklärt: Die von den basischen Aminosäuren durch die positiv geladenen N-Atome ausgehenden elektrostatischen Anziehungskräfte werden durch die bei steigender Ionenstärke des Puffers zunehmenden negativen Phosphat-Ionen abgeschirmt, so daß die Anziehungskraft zwischen positivem N-Atom und negativem Sulfonamid-Ion verringert wird. In unseren Versuchen konnten wir aber die Molarität des Puffers nicht beliebig gering wählen, da eine isotone Molarität ($1/8m$) Voraussetzung dafür ist, daß die Muskelzellen nicht durch osmotische Druckdifferenzen geschädigt werden. Sollten die Bindungswerte durch die von uns gewählte Molarität des Puffers beeinflußt worden sein, so wirkt sich dieser Einfluß auf alle Ergebnisse gleich aus. Da für die Beurteilung der Ergebnisse nicht der absolute Wert sondern der Vergleich der Werte für Homogenat und Muskel entscheidend ist, ist dieser Einfluß für unsere Aussage unmaßgeblich.

c) Wahl des Incubationsgefäßes:

Bei der Incubation der Zwerchfelle ist ein möglichst kleines Volumen der Incubationslösung wünschenswert, damit das Verhältnis Muskelgewebe : Volumen möglichst groß ist. Wird nämlich dieses Verhältnis zu klein, so werden auftretende Konzentrationsdifferenzen vor und nach Incubation ebenfalls sehr klein und kommen eventuell im Bereich der Streubreite zu liegen. Andererseits müssen die Zwerchfelle vollständig von Flüssigkeit bedeckt sein. Deshalb wurden pro Versuch 2 Zwerchfelle in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml Flüssigkeit incubiert. Dabei fanden die Zwerchfelle ohne Faltungen Platz und waren ganz von Flüssigkeit bedeckt.

Außerdem wurden durch die Incubation von 2 Zwerchfellen individuelle Schwankungen in der Bindung an Muskelproteine verringert. Solche Unterschiede werden bei der Bindung an menschliche Plasmaproteine beschrieben: Nach Curry (1970) variierte der gebundene Anteil von Chlorpromazin zwischen 91,0 und 99,0%. Hooper et al. (1973) beobachteten Bindungsschwankungen bei Diphenylhydantoin an 60 Probanden zwischen 85,0 und 93,0%. Geringere Unterschiede erhielten Chignell et al. (1971) bei Sulfaphenazol, Boman und Ringberger (1974) bei Rifampicin und Ehrnebo et al. (1974) bei Pentazocin.

d) Wahl der Substanzen:

Die Substanzen wurden nach möglichst verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften ausgewählt, und zwar nach

- Molekulargewicht: von 138 (Salicylsäure) bis 420 (Methanthelin)
- pK_a -Wert: Basen: 4,3 (Chlordiazepoxid) bis ca. 13 (Methanthelin)
Säuren: 3,0 (Salicylsäure) bis 10,5 (Sulfaguanidin)

Der Ionisationsgrad schwankte also von 1% (Chlordiazepoxid) bis 99% (Salicylsäure und Methanthelin)

- Verteilungskoeffizient_{Octanol/Wasser}:

606,13 (Thiopental) bis 0,0287 (Salicylsäure) und vermutlich noch kleiner, aber nicht genau bestimmbar bei Methanthelin.

2. Kritik der Methode

a) Herstellung des Muskelhomogenates:

Nach der in Absatz (II) beschriebenen Methode wurden je nach Muskelmasse 1,5 bis 2,0 g Zwerchfell in 7 ml Puffer homogeniert. Dabei kam es darauf an, das Muskelgewebe möglichst vollständig zu homogenisieren, damit eventuelle Unterschiede in der Bindung an Zwerchfellmuskel und Zwerchfellmuskelhomogenat deutlich werden. Dies wurde folgendermaßen geprüft: Eine schlecht lipidlösliche Substanz (Methanthelin) wurde mit den Zwerchfellen verschieden lange incubiert (s. Tabelle 4). Nach anschließendem Homogenisieren zeigte sich, daß durch längeres Incubieren zwar die vom intakten Zwerchfell aufgenommene Substanzmenge angestiegen war, daß aber die Bindung an das Homogenat im Bereich der Streuung gleich bleibt. Man kann daher annehmen, daß der Grad der Homogenisierung ausreicht, um im Homogenat einen 100%igen Konzentrationsausgleich zwischen Zellinnerem und Incubationslösung zu erhalten.

Tabelle 4

Abhängigkeit des Diffusionsgleichgewichts und der Bindung an Zwerchfellhomogenat von der Incubationsdauer bei Methanthelin.

Incubationsdauer	Diff.Gl.Gew. in %	Bindung an Homog.(%)
12 h	60	90,5 $\pm$ 0,5
36 h	92	90,8 $\pm$ 0,4
60 h	ca. 100	91,2 $\pm$ 0,5

b) Incubationszeit:

Bei zu kurzer Incubationszeit würde die vom intakten Muskel aufgenommene Substanzmenge geringer sein als nach Homogenisieren. Dies war bei Methanthelin nach 12 bzw. 36 stündiger Incubationszeit der Fall. Daß diese Differenz nicht auf eine größere Bindungskapazität des Homogenates zurückzuführen ist, zeigte sich durch Verlängerung der Incubationszeit auf 60 Stunden, wobei sich die vom intakten Muskel aufgenommene Substanzmenge der des Homogenates anglich.

c) Ultrafiltration:

Zur Bestimmung der Bindung von Substanzen an Proteine werden viele Möglichkeiten aufgeführt (Chignell 1971). Die am häufigsten verwendeten Methoden sind Dialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Gelfiltration. Nach Kurz und Trunk (1967) ist bei der Dialyse der Fehler am geringsten. Wegen der Dicke des Muskelhomogenates würde jedoch in unseren Versuchen die benötigte Dialysierzeit unvertretbar lange werden, da ein Konzentrationsausgleich nur durch Diffusion und nicht durch Konvektion erfolgen könnte. Aus demselben Grund (Dickflüssigkeit des homogenierten Muskels) ist auch die Gelfiltration nicht anwendbar.

Ultrazentrifugation ist eine technisch sehr aufwendige Methode. Außerdem kann man pro Zentrifuge^{x)} nur jeweils 10 Proben zentrifugieren, sodaß wir uns bei unseren Versuchen für die Ultrafiltration entschieden. Diese Methode ist auch bei hochkonzentrierten Proteinlösungen, z.B. Gewebshomogenaten anwendbar und kann relativ schnell und einfach ausgeführt werden. In der Literatur wird die Ultrafiltration unterschiedlich bewertet. Nach Scholtan (1961) sind quantitative

^{x)} Spinco-Ultrazentrifuge der Fa. Beckmann

Angaben mittels Ultrafiltration nur bedingt erhältlich.

v.Bruck und Kuhne (1962) halten die Ultrafiltration zur Bestimmung der Bindung von Substanzen an Proteine für ungeeignet.

Dem stehen Mitteilungen über befriedigende Übereinstimmung von Ultrafiltration und Dialyse gegenüber (Flexner 1937, Garn und Kimbel 1961, Schach v. Wittenau und Yeary 1963, Kunin 1966). Spring (1966) berichtet über gute Übereinstimmung seiner durch Dialyse gewonnenen Werte mit den durch Ultrafiltration gewonnenen Werten Rieders (1963). Nach Kurz und Trunk (1967) ist zumindest bis zu einem Molekulargewicht von 300 eine gute Übereinstimmung zwischen Dialyse und Ultrafiltration zu beobachten. Eventuell sind deshalb die Bindungswerte für Methanthelin (MG = 420) etwas zu hoch. Kurz et al. (1976) berichten über gute Reproduzierbarkeit der Ultrafiltrationsmethode.

d) Berechnung des gebundenen Anteils:

Durch eigene Messungen erhielten wir einen Wassergehalt des Zwerchfells von 76%, der in die Formel zur Berechnung der Proteinbindung eingesetzt wird. Dies setzt voraus, daß das gesamte Muskelwasser als Lösungsmittel zur Verfügung steht, was nach Sundermann (1932) und Greenberg (1933) der Fall ist. Eigene Messungen ergaben einen Sehnenanteil (Centrum tendineum) am gesamten Zwerchfell von ca. 2%, so daß etwa 98% auf Muskelgewebe entfallen. 90% der Trockensubstanz des Muskels bestehen aus Protein (Reichel 1960), sodaß Lipide und Mucopolysaccharide, an die auch eine Bindung von Pharmaka möglich ist (Schanker 1964), einen sehr geringen Anteil ausmachen. Von den Proteinen wiederum besteht der größte Teil aus

Myofibrillen, sogenannten unlöslichen Proteinen, nämlich 54% Myosin, 21% Actin und 15% Tropomyosin B. Nur etwa 10% entfallen auf sarkoplasmatische Proteine (z.B. Myoglobin und Glycolyse-Enzyme), auf Proteine in Granula (z.B. Enzyme des Citratzyklus) und Stroma-Proteine, welche das Sarkolemm bilden (Szent-Györgyi 1960). Es ist also anzunehmen, daß bei der Bindung von Pharmaka an Muskelgewebe die kontraktile Proteine als Bindungspartner eine große Rolle spielen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Filatova und Shtrankfeld (1969) sowie Genazzani und Santamaria (1969) gut überein, wonach z.B. Glycoside von kontraktile Proteinen 2 x so stark gebunden werden wie von Albumin.

Um zu vermeiden, daß die Bindungswerte vom Verhältnis Incubationsvolumen zu Gewebemasse abhängig sind, ist bei unseren Berechnungen die an Protein gebundene Substanzmenge nicht auf die Gesamtmenge in der Incubationslösung, also in 10 ml, sondern auf die insgesamt vom Muskel aufgenommene Menge bezogen. Diese ist nur von der Konzentration, nicht vom Volumen der Incubationsflüssigkeit abhängig. Hätten wir die Bindung auf die gesamte Incubationsflüssigkeit bezogen, so würde nach Gillette (1963) folgende Gleichung gelten:

$$D_T = c_f \times V + D_B \times G$$

wobei D_T = Gesamtmenge d. Substanz im Volumen V (vor Incubation)

c_f = freie Konzentration nach Incubation

D_B = gebundene Menge pro g Gewebe

G = Gewebe (in g) im Ansatz

Dividiert man diese Gleichung durch V, so erhält man

$$\frac{D_T}{V} = c_f + \frac{D_B \times G}{V}$$

Da $\frac{D_T}{V}$ = Konzentration der Substanz vor Incubation folgt: Für $V \rightarrow \infty$ wird die nach Incubation freie Konzentration c_f gleich der Konzentration vor Incubation und die Bindung geht somit gegen Null.

3. Diskussion der Ergebnisse

- a) Vergleich zwischen intaktem Muskel und Muskelhomogenat:
- Pharmaka müssen im allgemeinen viele Barrieren passieren, um an ihren Wirkort zu gelangen, z.B. das Oberflächenepithel, das Capillarendothel, die Zellmembran und intrazelluläre Membranen (Hogben 1971), wobei die Lipidlöslichkeit eine große Rolle spielt (Kurz 1970, Raaflaub 1970). Bei den Permeationsvorgängen in unseren Versuchen sind besonders die Zellmembranen, aber auch die intrazellulären Membranen, von Brodie 1964 beschrieben, von Bedeutung. Die Baustoffe der Muskelzellmembran sind zu 60% Proteine und zu 40% Phospholipide (Hasselbach 1971). Einstülpungen der Muskelzellmembran quer zur Faserrichtung, das sogenannte T-System, vergrößern die Zelloberfläche. Für die genaue Struktur dieser Membran sind schon verschiedene Modelle erarbeitet worden (Overton 1899, Collander und Bärlund 1933, Danielli und Davson 1935, Wallach und Gordon 1968).
- Dettli und Spring definieren eine Membran als jede Struktur, durch welche der Transport in anderer Weise vor sich

geht als im umgebenden Medium. Dafür sind verschiedene Mechanismen bekannt, z.B. einfache Diffusion, non-ionic diffusion, erleichterte Diffusion als passive, beschleunigte Penetration und aktiver Transport als aktive Mechanismen.

Die aktiven Mechanismen sowie die erleichterte Diffusion spielen wegen ihrer hohen Spezifität keine große Rolle für körperfremde Substanzen (Raaflaub 1970). Immerhin beobachteten Schanker und Morrison (1966) am Herzen der Ratte einen Unterschied zwischen der Bindung von Guanethidin in vitro (ca. 70%) und in vivo (95 - 98%). Die Konzentration im Herzmuskel stieg dabei nicht linear mit der verabreichten Dosis an, sondern zeigte eine Sättigungskurve. Durch Amphetamin oder durch anaerobe Bedingungen konnte ein spezifisches Transportsystem gehemmt werden. Dieses Phänomen fanden sie jedoch am Skelettmuskel der Ratte nicht, wo mit steigender Dosis die Muskelkonzentration linear anstieg. Bei unseren Versuchen sind aktive Transportprozesse jedoch schon weitgehend dadurch ausgeschlossen, daß wir bei sehr geringen Temperaturen (+2 Grad C.) gearbeitet haben. Man kann daher annehmen, daß die von uns verwendeten Substanzen durch einfache oder durch non-ionic Diffusion, also proportional zum Konzentrationsgradienten in die Zelle gelangten.

Da ein eventueller Unterschied in der Bindung an Zwerchfellmuskel und Zwerchfellmuskelhomogenat durch die Zellmembran, dem Haupthindernis beim Eintritt von Pharmaka in die Zelle bedingt wäre, sollen diese Diffusionsmechanismen näher beschrieben werden.

- Einfache Diffusion:

Eine kontinuierliche Wasserphase durch die Zellmembran ist durch Poren in der Membran möglich, durch die hauptsächlich hydrophile Substanzen permeieren können. Nahezu unbehindert

permeieren aber nur Stoffe bis zur Größe des Harnstoffs (Höber 1947).

- non-ionic diffusion:

Die Diffusion durch eine Nicht-Wasser-Phase ist der Haupteintrittsweg für körperfremde Substanzen, da im Gegensatz zur einfachen Diffusion eine erheblich größere Diffusionsfläche zur Verfügung steht. Ein Zusammenhang zwischen Diffusionsgeschwindigkeit und Verteilungskoeffizienten ist mehrfach beschrieben worden (Höber 1947, Sandell 1958, Feltkamp 1965, Kurz 1970). Substanzen mit sehr hohem Verteilungskoeffizienten diffundieren jedoch wieder langsamer, da sie schwerer in die intrazelluläre Wasserphase übergehen (Leo und Hansch 1971). Da Ionen schlecht lipidlöslich sind, und Kationen noch langsamer diffundieren als Anionen, sind quartäre Stickstoffverbindungen fast völlig undiffusibel (Burgen und Chipman 1951, Jollow 1972). Dies stimmt mit der sehr langen Incubationszeit bei Methanthelin in unseren Versuchen sehr gut überein.

Zwar gibt Staubesand (1964) noch eine weitere Transportmöglichkeit an, nämlich die Membranvesikulation. Sie soll besonders bei Muskelzellen auftreten, da diese keine Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung haben. Diese Permeationsmöglichkeit ist jedoch sehr langsam und dürfte quantitativ nur eine geringe Rolle spielen. Außerdem erfordert sie wie der aktive Transport Stoffwechselenergie.

Da am Homogenat die Zellwand als Permeationshindernis größtenteils fortfällt, kann der Konzentrationsausgleich durch einfache Diffusion erfolgen. Dadurch wäre denkbar, daß z.B. eine sehr wenig lipidlösliche Substanz durch das Homogenisieren in einer höheren Konzentration an die intrazellulären Proteine gelangt als dies

am intakten Muskel oder in vivo der Fall ist. Somit könnte an das Homogenat eine größere Menge gebunden werden.

Andererseits könnten durch das Homogenisieren Proteine in ihrer räumlichen Anordnung in der Zelle verändert werden, so daß daraus eine unterschiedliche Bindung zum intakten Muskel resultieren könnte.

Bei unseren Versuchen war zwischen dem an den Muskel und dem an das Muskelhomogenat gebundenen Anteil in keinem Fall ein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten. Zwar wäre theoretisch denkbar, daß die oben erwähnten Effekte zusammen auftreten, jedoch ist sehr unwahrscheinlich, daß sich diese Effekte bei allen Substanzen genau aufheben.

b) Vergleich der Bindung an menschlichen Muskel und an Rattenmuskel:

Um die am Rattenmuskel gewonnenen Ergebnisse mit den von Fichtl (1974) am menschlichen Muskelhomogenat gemessenen Werten vergleichen zu können, war Voraussetzung, bei den gleichen Versuchsbedingungen zu arbeiten.

- Temperaturabhängigkeit:

Bei Plasmaproteinen wurde eine Temperaturabhängigkeit der Bindung mehrfach beschrieben; sie soll besonders bei niedrig gebundenen Substanzen erheblich sein (Scholtan 1964c, Keen 1965, Nemethy 1967).

Die Temperatur betrug in beiden Versuchen ca. +2 Grad C.

- Abhängigkeit von der Substanzkonzentration:

Nach Keen (1965) ist die prozentuale Bindung an Plasmaproteine zwischen 0,1 und 10 μ /ml konstant. Bei höheren Konzentrationen steigt die absolut gebundene Menge an, aber der relativ

gebundene Anteil sinkt (Goldbaum und Smith 1954, Davison 1961), was mit den gefundenen Werten für Thiopental am Rattenmuskel gut übereinstimmt ($0,8 \times 10^{-4}\text{m}$: 93,2% Bindung, $2 \times 10^{-4}\text{m}$: 91,8% Bindung). Auch bei allen anderen Substanzen arbeiteten wir wie Fichtl mit einer Konzentration von $2 \times 10^{-4}\text{m}$.

Unterschiede, die bei der Bindung derselben Substanz in beiden Untersuchungen auftreten, können folgende Ursachen haben:

- Speziesunterschiede:

Nach Keen (1965) und Friemel (1968) werden auch chemisch nahe verwandte Stoffe bei jeder Art verschieden stark an Plasmaproteine gebunden. Ursachen dafür sind möglicherweise

- spezifische Bindung einiger Pharmaka, z.B. Phenylbutazon über Zn-Ionen

- artverschiedene Aminosäuresequenz, Sekundär- oder Tertiärstruktur der bindenden Proteine

- Unterschiede in der kompetitiven Verdrängung des Pharmakons von der Bindungsstelle durch Cholesterin, Bilirubin oder Hormone.

- pH-Abhängigkeit:

Während Fichtl bei intrazellulärem pH von 7,0 (Waddel und Butler 1959, Schanker 1962) arbeitete, incubierten wir die Zwerchfelle bei pH 7,4, d.h. extrazellulärem pH. Eine pH-Abhängigkeit der Bindung ist bei Plasmaproteinen beschrieben (Goldbaum und Smith 1954, Kriegelstein 1969, Mohr 1970).

Klimek und Kurz (1969) finden bei sehr starken und sehr schwachen Elektrolyten im physiologischen pH-Bereich keine Bindungsänderung.

- Abhängigkeit von der Homogenatkonzentration:

Während unsere Ergebnisse der Bindung an unverdünntes Homogenat entsprechen, arbeitete Fichtl mit 95% Homogenat.

v.Witzgall (1964) und Davison (1961) beschrieben, daß aus einer höheren Proteinkonzentration eine höhere Bindung resultiere. Dieser Unterschied kann aber nicht sehr groß sein, da sich die Bindung asymptotisch an den Wert der Bindung für 100% Homogenat annähert.

Unterschiede in der Bindung an Rattenmuskel und Menschenmuskel wirken sich bei Thiopental, Chlordiazepoxid und Sulfamethoxydiazin nur gering aus (2 - 5%), während sie bei Phenobarbital, Sulfaguanidin und Salicylsäure 15 - 25% betragen (s. Tab. 3).

Aus der in Abb. 5 gezeigten Korrelation zwischen der Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelhomogenat und an das der Ratte erscheint ableitbar, daß diese Bindung nach ähnlichen Gesetzmäßigkeiten abläuft, d.h. daß beide Muskelproteine ähnliche Bindungseigenschaften besitzen.

Die Bindung an den Muskel der Ratte ist durchschnittlich um den Faktor 1,5 höher als beim Menschen. Wegen der geringen Zahl der verglichenen Substanzen (6) und wegen der bereits erwähnten Unterschiede in den beiden Arbeiten kann man aber noch keine allgemeingültige quantitative Aussage darüber machen, inwieweit am Rattenmuskel gewonnene Bindungswerte auf die Verhältnisse beim Menschen übertragbar sind.

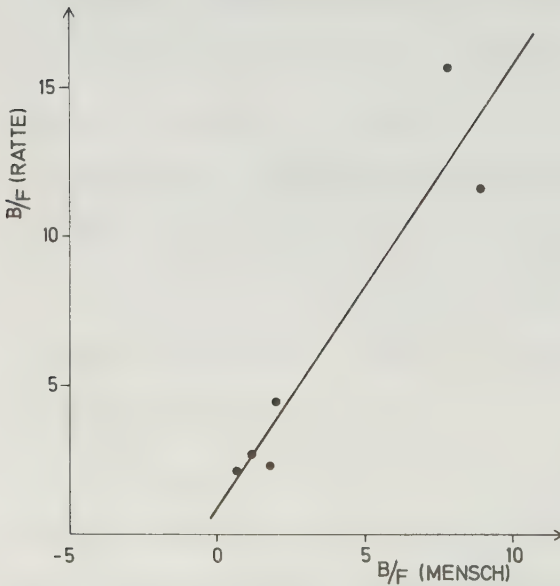
Abbildung 5

Korrelation zwischen der Bindung an menschliches Muskelhomogenat und an Homogenat aus Rattenmuskel. B/F ist das Verhältnis von gebundenem Anteil zu freien Anteil.

Eingezeichnet ist die Regressionsgerade:

$$B/F \text{ (Rattenmuskel)} = 1,5 \times B/F \text{ (Menschenmuskel)} + 0,88$$

Der Korrelationskoeffizient ($r = 0,942$) ist mit $p < 0,01$ signifikant.



- c) Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizient $\text{Octanol/H}_2\text{O}$ 7,4 und Bindung von Pharmaka an Muskelprotein der Ratte:

Da der Verteilungskoeffizient zwischen einer wässrigen Phase und den Lipiden der biologischen Membranen nicht direkt bestimmt werden kann, ist es nötig, den Verteilungskoeffizient an Modellen, nämlich organischen Lipidphasen zu bestimmen. Diese haben den Nachteil, daß die Verteilungskoeffizienten gleicher Substanzen in den verschiedenen Lipidphasen unterschiedlich sind (Feltkamp 1965, Appiah 1971). Um eine etwaige Korrelation zwischen Proteinbindung und Lipidlöslichkeit, die bereits mehrfach beschrieben wurde (Scholtan 1964d, Kurz 1970, Appiah 1971), aufzeigen zu können, muß eine Lipidphase gewählt werden, welche die für die Proteinbindung maßgeblichen lipophilen Eigenschaften besitzt. Nach Leo et al. (1971) erweist sich Octanol als dafür geeignet.

Abbildung 6 zeigt für 7 untersuchte Substanzen den Zusammenhang zwischen ihrem Octanol/Puffer-Verteilungskoeffizienten und ihrer Bindung an Muskelprotein. Das Ausmaß der Bindung wurde dazu als Quotient aus gebundenem und freiem Anteil (B/F) ausgedrückt. Dieser Quotient ist näherungsweise proportional der Bindungskonstanten.

Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, daß mit steigendem Verteilungskoeffizienten auch das Ausmaß der Bindung an Muskelprotein ansteigt. An einer Gruppe von 7 chemisch und physikalisch sehr verschiedenen Substanzen konnte also gezeigt werden, daß die Hydrophobie einen wichtigen Faktor für die Bindung darstellt.

Dieser Zusammenhang wurde bereits mehrfach beschrieben: Goldbaum und Smith (1954) beobachteten einen Anstieg der

Bindung von Barbituraten an Muskelprotein des Kaninchens durch Verlängerung der Seitenketten der Substanzen.

Davison (1961) konnte zeigen, daß die Bindung von Salicylaten an Albumin steigt, wenn lange aliphatische Ketten in die Substanzen eingeführt werden. Kiehs et al. (1966) beschrieben am Rinderhämoglobin einen Anstieg der Bindung bei zunehmender Hydrophobie verschiedener Substanzen. Nach Scholtan (1964d) vergrößern alle Substituenten, welche die lipophilen Eigenschaften einer Substanz erhöhen, auch deren Bindung an Plasma-protein und umgekehrt.

Diese, mehrfach gesicherte Beziehung zwischen Verteilungskoeffizient und Bindung an Proteine deutet darauf hin, daß hydrophobe Wechselbeziehungen bei der Anlagerung einer Substanz an die Bindungsstelle des Proteins eine große Rolle spielen. Man nimmt an, daß diese Bindungsart durch Entropiezunahme energetisch besonders begünstigt ist (Scholtan 1964c, Nemethy 1967, Aly 1968). Die beträchtliche Streuung um die Regressionsgerade zeigt jedoch, daß auch noch andere Bindungsmechanismen (elektrostatische Bindung, Bindung über Wasserstoffbrücken) von Bedeutung sind. Da z.B. die untersuchten Substanzen erhebliche Unterschiede in ihrem Ladungszustand aufweisen, ist leicht verständlich, daß sich die elektrostatischen Bindungskräfte für jede Substanz unterschiedlich auswirken.

Abbildung 6

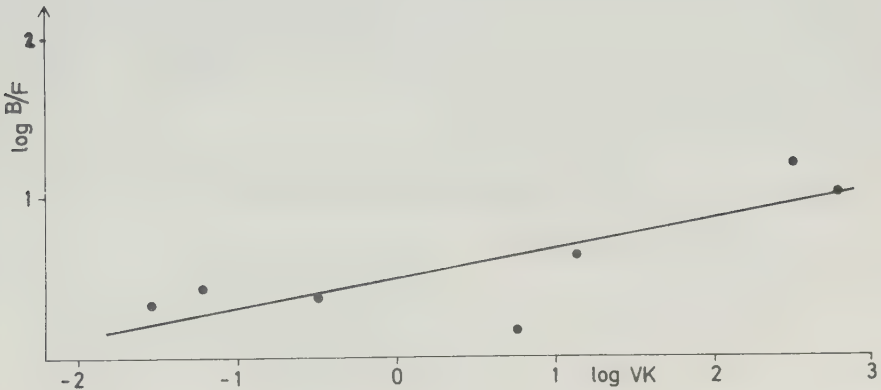
Zusammenhang zwischen der Bindung an Rattenmuskel ($\log B/F$) und dem Verteilungskoeffizienten Octanol-Puffer ($\log VK$).

B/F ist das Verhältnis von gebundenem Anteil zu freiem Anteil.

Eingezeichnet ist die Regressionsgerade:

$$\log B/F = 0,18 \times \log VK + 0,50$$

Der Korrelationskoeffizient ($r = 0,814$) ist mit $p < 0,05$ statistisch auffällig.



V. ZUSAMMENFASSUNG

Von 8 Substanzen wurde die Bindung an Zwerchfellmuskel und an Zwerchfellmuskelhomogenat der Ratte mittels Ultrafiltration vergleichend bestimmt. Es zeigte sich, daß durch das Homogenisieren keine Veränderung in der Bindung eintrat.

Die gemessenen Bindungswerte für Homogenat wurden mit Literaturangaben über die Bindung an menschliches Muskelhomogenat verglichen. Dabei fand sich eine Korrelation zwischen der Bindung an Muskelhomogenat von Ratte und Mensch. Dies läßt auf ähnliche Bindungseigenschaften des Muskelgewebes beider Spezies schließen.

Beim Vergleich von Bindung an Muskelprotein der Ratte und den Verteilungskoeffizienten der untersuchten Substanzen ergab sich ein Zusammenhang zwischen Lipidlöslichkeit und Muskelbindung. Dies läßt darauf schließen, daß die Hydrophobie für die Bindung von Pharmaka an Proteine eine Rolle spielt.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I N I S

ALY, F.W., BRAUN, H.J., HADAM, W.R., KALLEE, E.

Zur Bedeutung der Eiweißvehikelfunktion.

Arzneimittel-Forsch. 18: 1467 - 1482 (1968)

APPIAH, A.

Eignung verschiedener Verteilungsmodelle zur Beurteilung der Permeabilität biologischer Membranen für Arzneimittel.

Dissertation, Universität München (1971)

BEYER, K.H., SADEE, W.

Spektrophotometrische Bestimmung von 5-Phenyl-1,4-benzodiazepin-derivaten und Untersuchungen über den Metabolismus des Nitrazepams.

Arzneimittel-Forsch. 19: 1929 - 1931 (1969)

BOMAN, G., RINGBERGER, V.A.

Binding of Rifampicin by Human Plasma Proteins

Europ. J. clin. Pharmacol. 7: 369 - 373 (1974)

BRATTON, A.C., MARSHALL, E.K.

A new coupling component for sulfanilamid determination.

J. biol. Chem. 128: 537 - 550 (1939)

BRODIE, B.B., KURZ, H., SCHANKER, L.S.

The importance of dissociation constant and lipid-solubility in influencing the passage of drugs into the cerebrospinal fluid.

J. Pharmacol. 130: 20 - 25 (1960)

BRODIE, B.B.

Distribution and fate of drugs.

In: Absorption and distribution of drugs.

T.B. Binns ed. Livingstone, Edinburgh, London (1964)

BRODIE, B.B., MARK, L.C., PAPPER, E.M., LIEF, P.A.,

BERNSTEIN, E., ROVENSTEIN, E.A.

The fate of Thiopental in man and a method for its estimation in biological material.

J. Pharmacol. 98: 85 - 96. (1950)

v. BRUCK, C.G., KUHNE, J.

Zur Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrafiltermethode.

Arzneimittel-Forsch. 12: 1116 - 1119, (1962)

BURGEN, A.S.V., CHIPMAN, L.M.

The location of Cholinesterase in the central nervous system.

Quart. J. exp. Physiol. 37: 61 - 74 (1952)

CHIGNELL, C.F., VESELL, E.S., STARKWEATHER, D.K., BERLIN, C.M.

The binding of Sulfaphenazole to fetal, neonatal and adult human plasma albumin.

Clin. Pharmacol. Therap. Vol. 12, Nr. 6, 897 - 901 (1971)

CHIGNELL, C.F.

Physical methods for studying drug protein binding.

In: Hdb. d. exp. Pharmakologie XXVIII/1, 187 - 212 (1971)

Springer-V., Berlin, Heidelberg, New York

COLLANDER, R., BÄRLUND, H.

Permeabilitätsstudien an Chara Ceratophylla.

Acta bot. fenn. 11: 1 - 114 (1933)

CURRY, S.H.

Plasmaprotein binding of Chlorpromazine.

J. Pharm. Pharmacol. 22: 193 - 197 (1970a)

CURRY, S.H.

Theoretical changes in drug distribution resulting from changes in binding to plasma proteins and to tissues.

J. Pharm. Pharmacol. 22: 753 - 757 (1970b)

DANIELLI, J.F., DAVSON, H.

A contribution to the theory of permeability of thin films.

J. Cell. Comp. Physiol. 5: 495 - 508 (1935)

DAVISON, C.

The binding of Salicylic Acid and related substances to purified proteins.

J. Pharmacol. 133: 161 - 170 (1961)

DETTLI, L., SPRING, P.

Beeinflussung der Resorption durch zelleigene und zellfremde Stoffe.

Pharmaz. Ztg. Berlin, 109: 1055 - 1060 (1964)

EHRNEBO, M., AGURELL, S., BORENS, L.O., GORDON, E., LÖNROTH, V.

Pentazocine binding to blood cells and plasma proteins.

Clin. Pharmacol. Therap. Vol. 16, Nr. 3, 424 - 429 (1974)

FELTKAMP, H.

Das Verteilungsverhalten von Barbitursäurederivaten.

Arzneimittel-Forsch. 15: 238 - 242 (1965)

FICHTL, B.

Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe.

Dissertation, Universität München (1974)

FILATOVA, L.G., SHTRANKFELD, I.G.

Interactions between the dye congo-red and the contractile protein of muscle.

Biofizika 13: 899 (1968), nach Chem. Abstracts 70: 34374K (1969)

FLEXNER, L.B.

A thermodynamic analysis of ultrafiltration.

J. Biol. Chem. 121: 615 - 630 (1937)

FRIEMEL, G.

Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten.

Dissertation, Universität München (1968)

GARN, F.W., KIMBEL, K.H.

Verbleib und Ausscheidung von Depot-Sulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 11: 701 - 707 (1961)

GENAZZANI, E., SANTAMARIA, R.

Interactions of cardiac glycosides with serum albumin and contractile proteins.

Pharmacol. Res. Commun. 1: 249 - 257 (1969)

GILLETTE, J.R.

Reversible binding as a complication in relating the in vitro effect of drugs to their in vivo activity.

Proc. 2nd Int. Pharmacol. Meeting 4: 9 - 21 (1963)

GOLDBAUM, I.R., SMITH, P.K.

The interaction of barbiturates with serum albumin and its possible relation to their disposition and pharmacological actions.

J. Pharmacol. 111: 197 - 209 (1954)

GOLDBAUM, I.R.

An ultraviolet spectrophotometric procedure for the determination of barbiturates.

J. Pharmacol. 94: 68 - 75 (1948)

GOLDSTEIN, A.

The Interactions of drugs and plasma proteins.

Pharmacol. Rev. 1: 102 - 165 (1949)

GREENBERG, D.M., GREENBERG, M.M.

Ultrafiltration: II bound water of biological colloids.

J. Gen. Physiol. 16: 559 - 569 (1933)

HASSELBACH, W.

Physiologie des Menschen, Bd. IV: Muskel.

Verlag Urban Schwarzenberg München (1971)

HÖBER, R.

Die Permeabilität der Zellen für organische Nichtelektrolyte.

In: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe, Kap. 10, 253 - 268

Verlag Stämpfli und Cie., Bern (1947)

HOGBEN, C.A.M.

Biological membranes and their passage by drugs.

In: Hdb. d. exp. Pharmakologie XXVIII/1, 1 - 8 (1971)

Springer-V., Berlin, Heidelberg, New York

HOOPER, W.D., BOCHNER, F., EADIE, M.J., TYRER, J.H.

Plasma protein binding of Diphenylhydantoin.

Clin. Pharmacol. Therap. Vol. 15, Nr. 3, 276 - 282 (1973)

JOLLOW, D.J.

Mechanism of drug absorption and of drug solution.

J. Pharmacol. 8: 21 - 32 (1972)

KEEN, P.M.

The binding of three penicillins in the plasma of several species as studied by ultrafiltration at body temperature.

Brit. J. Pharmacol. Chemotherap. 25: 507 - 514 (1965)

KEEN, P.

Effect of binding to plasma proteins on the distribution, activity and elimination of drugs.

In: Hdb. d. exp. Pharmakologie XXVIII/1, 213 - 233 (1971)

Springer-V., Berlin, Heidelberg, New York

KIEHS, K., HANSCH, C., MOORE, L.

The role of hydrophobic bonding in the binding of organic compounds by bovine hemoglobin.

Biochemistry 5: 2602 - 2605 (1966)

KLIMEK, H., KURZ, H.

Dependence of protein-binding on hydrogen ion concentration.

Abstracts, 4th international congress on pharmacology,
July 14th-18th in Basel, Switzerland, page 15 (1969)

KRIEGELSTEIN, J.

Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.

Klin. Wochenschr. 47: 1125 - 1130 (1969)

KUNIN, C.M.

Clinical Pharmacology of the new penicillins I.

Clin. Pharmacol. Therap. 7: 166 - 179 (1966)

KURZ, H.

Einfluß der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Kurz-
narkotika auf den "hang over".

Arch. Pharmak. 255: 33 (1966)

KURZ, H., TRUNK, H.

Some interfering factors in determining the protein-bound
fraction of chemotherapeutics.

Vortrag V. Internationaler Kongress für Chemotherapie, Wien (1967)

KURZ, H.

Die Bedeutung der Lipidlöslichkeit in der Pharmakologie.

Präp. Pharmazie 6: 1 - 12 (1970)

KURZ, H., TRUNK, H., WEITZ, B.

Evaluation of methods to determine protein binding:

equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation
and gel-filtration.

Arzneimittel-Forsch. Zur Veröffentlichung angenommen. (1976)

LEO, A., HANSCH, C., ELKINS, D.

Partition coefficients and their uses.

Chemical Reviews Vol. 71/Nr.6, 525 - 616 (1971)

MEYER, M.C., GUTMAN, D.E.

The binding of drugs by plasma proteins.

J. Pharm. Sci. 57: 895 - 918 (1968)

MOHR, E.

Die Abhängigkeit der Bindung von Arzneimitteln an die Plasma-
proteine von der Wasserstoffionenkonzentration.

Dissertation, Universität München (1970)

NEMETHY, G.

Hydrophobe Wechselwirkungen.

Angew. Chemie 79: 260 - 271 (1967)

OVERTON, E.

Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre
vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie.

Vjschr. d. Naturf. Ges. Zürich 24: 88 - 135 (1899)

RAAFLAUB, J.

Über die Beziehungen zwischen der Lipidlöslichkeit von
Pharmaka und ihrem pharmakokinetischen Verhalten.

Experientia 26: 457 - 467 (1970)

REICHEL, H.

Muskelphysiologie.

Springer-V., Berlin, Göttingen, Heidelberg, (1960)

RIEDER, J.

Prüfung der Ultrafiltrationsmethode zur Bestimmung der
Eiweißbindung von Pharmaka mittels radioaktiver Präparate.

Vortrag V. Internationaler Kongress für Chemotherapie, Wien (1967)

RIEDER, J.

Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen an
Sulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 13: 81 - 88 (1963)

SANDELL, K.B.

Über die Verteilung organischer Verbindungen zwischen
Wasser und organischen Lösungsmitteln.

Monatshefte f. Chemie 89: 36 - 52 (1958)

SCHACH v. WITTENAU, M., YEARY, R.

The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines
after intravenous administration to dogs.

J. Pharmacol. 140: 258 - 266 (1963)

SCHANKER, L.

Absorption of drugs from stomach in the rat.

J. Pharmacol. 120: 528 - 539 (1957)

SCHANKER, L.S.

Passage of drugs across body membranes.

Pharmacol. Rev. 14: 501 - 503 (1962)

SCHANKER, L.S.

Physiological transport of drugs.

Adv. in Drug Res. 1: 71 - 106 (1964)

SCHANKER, L.S., MORRISON, A.S.

Physiological disposition of guanethidine in the rat and its
uptake by heart slices.

Int. J. Neuropharmacol. 4: 27 - 39 (1966)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung von Langzeitsulfonamiden an die Eiweißkörper
des Serums.

Arzneimittel-Forsch. 11: 707 - 720 (1961)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper, 3. Mitteilung, 1. Teil
Arzneimittel-Forsch. 14: 348 - 356 (1964a)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper, 3. Mitteilung,
2. Teil.

Arzneimittel-Forsch. 14: 469 - 473 (1964b)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

Arzneimittel-Forsch. 14: 1139 - 1146 (1964c)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

Arzneimittel-Forsch. 18: 505 - 517 (1964d)

SMITH, P.K., GLEASON, H.L., STOLL, C.G., OGORZALEK, S.

Studies on the pharmacology of salicylates.

J. Pharmacol. 87: 237 - 255 (1946)

SPRING, P.

Die Bindung einiger Sulfonamide an die Bluteiweißkörper
des Menschen.

Arzneimittel-Forsch. 16: 346 - 354 (1966)

SUNDERMANN, F.W.

The osmotic behaviour of water of blood serum.

J. Biol. Chemistry 96: 271 - 283 (1932)

STAUBESAND, J.

Zur Morphologie der Aufnahme und der transzellulären Passage
von Stoffen durch Membranvesikulation.

Pharmaz. Ztg. 109: 1130 - 1136 (1964)

SZENT-GYÖRGYI, A.G.

Proteins of the myofibril.

In: Structure and function of muscle Bd. II

ed. G.H. Bourne, Academic Press, New York and London (1960)

WADDELL, W.J., BUTLER, T.C.

Calculation of intracellular pH from the distribution of 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidinedione (DMO). Application to skeletal muscle of the dog.

J. Clin. Invest. 38: 720 - 729 (1959)

WALLACH, D.F.H., GORDON, A.

Lipid-protein interactions in cellular membranes.

Fed. Proc. 27(6): 1263 - 1268 (1968)

Nach Chemical Abstracts 70: 278s (1969)

WITZGALL, H., BOYENS, H.

Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen und Bakterien für die Pharmakodynamik und Wirkung von Arzneistoffen.

Arch. Int. Pharmacodyn. 148: 511 - 535 (1964)

WEBER, H.H.

Die Muskeleiweißkörper und der Feinbau des Skelettmuskels.

Erg. der Physiol. 36: 109 - 150 (1934)

L e b e n s l a u f

Am 4. Oktober 1949 wurde ich, Norbert Rudolf Filous, als Sohn des Bauunternehmers Rudolf Filous und dessen Ehefrau Hildegard, geb. Kellermann, in München geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule an der Silberhornstraße.

1960 trat ich in das Albert Einstein Gymnasium München ein, wo ich 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1. Juli 1969 bis 30. Juni 1971 leistete ich Wehrdienst bei der Bundeswehr als Zeitsoldat auf 2 Jahre.

Im Wintersemester 1971/72 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität München für das Fach Medizin.

1973 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung.

Im Oktober 1977 legte ich die ärztliche Prüfung nach der neuen Approbationsordnung vom 28. 10. 1970 ab und erhielt die Approbation als Arzt.

